1E1415

PYPの発色団熱異性化過程における Methionin100 の効果

○熊内 雅人¹、佐々木 純¹、海野 雅司²、山内 清語²、徳永 史生¹ (¹ 阪大・理院・宇宙地球、² 東北大・反応研)

Ectothiorhodospira halophila の光受容タンパク質である Photoactive Yellow Protein(PYP)は低分子量(125 アミノ酸、14kD)で安定な水溶性タンパク質である。PYPは発色団に p-クマル酸を持ち可視光吸収(446nm)によって発色団の光異性化、フェノール性水酸基のプロトン化を経て、最終的には脱プロトン化、熱的な逆異性化を伴う一連の光反応サイクルを示す。

通常、二重結合の cis-trans 異性化反応は光反応過程では室温下でも容易に起こるが熱反応過程では困難である。PYPにおいては相当な低温下であっても容易に熱異性化過程が進行する。このように通常の化学反応過程では容易に進行し得ない現象が PYP の中で起こっている。メチオニン 100 をアラニンに置換した変異体(M100A)では M 中間体から暗状態への戻りの過程が遅くなると同時に暗状態と M 中間体が平衡に存在するという報告¹がある。このような現象の解釈としては Met → Ala の置換により M 中間体のエネルギーレベルが下がったか、暗状態と遷移状態のエネルギーレベルが共に高くなったかのいずれかが考えられる。本研究ではメチオニン 100 が発色団の速い熱異性化にどのように関与しているかを調べるために変異体 M100E、M100A、M100K を調製した。これらの変異体は野生型と比較して M 中間体が 10 倍～1000 倍長寿命化される。また暗状態の吸収極大波長が野生型に比べてわずかにシフトしていることから、1 0 0 位の残基は発色団に対して静電的または立体的相互作用をしていると考えられる。本講演では、これらの変異体の発色団および蛋白質部分の安定性に与える影響について報告し、M 中間体の崩壊速度に与えるメチオニン 100 の効果について議論する。

M Kumauchi, J Sasaki, M Unno, S Yamauchi, F Tokunaga : Effects of Met100 on the Thermal Isomerization Process of the Chromophore in PYP Photocycle

¹S.Devanathan,et al *Biochemistry*,,37,11563-11568

1E1445

Photoactive Yellow Protein の pB 中間体に対する分子動力学シミュレーション

○塩沢 真理子¹、依田 真樹¹、神谷 成敏¹、浅川 直紀¹、肥後 順一²、井上 義夫¹、櫻井 実¹ (¹ 東工大院 生命理工、² 生物学研究所)

Photoactive Yellow Protein は、Cys69 にチオールエステル結合した p-クマル酸を発色団として持つ光受容タンパク質であり、その光サイクルに pR と pB の少なくとも 2 つの中間体が存在する。特に、p B 中間体はタンパク質間の信号伝達に直接関与すると言われており、その構造を解明することは PYP の機能を分子レベルで理解する上で重要である。pB 中間体については既に X 線構造が報告されているが、生理条件下での構造は結晶中と大きく異なると考えられている。p B 中間体はタンパク質の準変性状態に対応するので、その構造を高分解能で実験により得ることは困難であり、計算化学法の適用が有効と思われる。本研究では、分子動力学計算(MD)により、pB 中間体の水溶液中における構造を分子レベルで解明することを目的とした。MD 計算は、X 線構造の周りに 3010 個の水を球状に発生させた系に対して行った。その他の計算条件は次の通りである。すなわち、1) 力場は Amber94、2) 温度 300K、3) NVT 一定アンサンブル、4) 時間刻み 1fs である。平衡化後、露出表面積(ASA)、RMSD、RMSF や特定の原子間距離を求めることにより、タンパク全体または発色団近傍の構造変化を解析した。その結果、5ns までではタンパク全体の大きなコンフォメーション変化は起らないが、発色団付近の 2 つのループで大きく揺らぐことがわかった。また、発色団周囲の水素結合ネットワークが切れ、水分子を含めた新しい水素結合を形成する様子を捉えることができた。さらに、3ns 経過後、Arg52 付近でのコンフォメーション変化が活発におこり、Glu46 の負電荷がタンパク表面側へ移動する様子もみられた。以上述べたような運動モードの発生は、より長時間のシミュレーションの後、発色団のフェノール付近より水分子がタンパク内部に侵入する可能性を示唆している。

M.Shiozawa,M.Yoda,N.Kamiya,N.Asakawa,J.Higo,Y.Inoue,M.Sakurai : Molecular Dynamics Simulation for the pB intermediate of Photoactive Yellow Protein

1E1430

共鳴ラマン分光法による Photoactive Yellow Protein 反応中間体の構造解析

○海野 雅司¹、熊内 雅人²、佐々木 純²、徳永 史生²、山内 清語¹ (¹ 東北大・反応研、² 阪大・理院・宇宙地球)

【序論】Photoactive Yellow Protein (PYP) は紅色光合成細菌中に含まれ、この細菌が示す負の走行性の光センサーだと考えられている。発色団はシステイン残基にチオエステル結合を介して結合した p-クマル酸で、暗状態では C=C 二重結合部位がトランス構造でフェノール部分が脱プロトン化している。PYP は可視光の吸収によって複数の反応中間体を経る一連の光反応サイクルを示し、発色団の異性化やプロトン化／脱プロトン化などを伴うと示唆されてきた。本研究では PYP における情報伝達過程に関与していると考えられている M 中間体に注目し、発色団の構造を共鳴ラマン分光法および密度汎関数法を用いた理論計算により解析したので報告する [1]。

【実験】暗状態 PYP の測定には Kr レーザーからの 406.7nm 光を用い、M 中間体は可視光の照射下 He-Cd レーザーの 325.0nm 光で測定した。

【結果】本研究において M 中間体の共鳴ラマンスペクトルの測定に初めて成功した。その結果、発色団はシス構造でありプロトン化していることを見いだした。更に、同位体置換体を用いた実験などからいくつかのラマン信号の帰属に成功した。

[1] M. Unno, M. Kumauchi, J. Sasaki, F. Tokunaga, & S. Yamauchi (2000) J. Am. Chem. Soc. 122, 4233.

M. Unno, M. Kumauchi, J. Sasaki, F. Tokunaga, and S. Yamauchi : Resonance Raman Investigation of M Intermediate of Photoactive Yellow Protein

1E1500

MD シミュレーションによる PYP の光異性化反応機構の解析

○山田 篤志¹、山本 茂義²、倭 剛久¹、垣谷 俊昭¹ (¹ 名大理、² 中京大)

Ectothiorhodospira halophila 由来の Photoactive Yellow Protein(PYP) は光センサーとして機能するタンパク質である。発色団(クマル酸)の光異性化反応が光情報伝達の機構であることが知られている。しかしタンパク質の構成原子の振る舞いや相互作用から光異性化を説明するという、いわゆる分子論的な立場からの解明がなされていない。そこで我々は計算機シミュレーションを用いて PYP の光異性化のメカニズムとプロセスを研究した。メカニズムを知るために、クマル酸の電子状態や断熱ポテンシャル面を量子化学計算により調べた。そしてそれを基に、水和したイエロープロテインのモデルを用いて実際に光異性化が再現されるかどうかを見るために励起状態分子動力学(MD)シミュレーションを行なった。我々は発色団の 2 重結合周辺の二面角に対し、断熱ポテンシャル面を sa-CASSCF/6-31g* を使って計算した。これらの計算によると 2 重結合の二面角ポテンシャルは基底状態と第一励起状態の交差型ポテンシャルであった。そこでクマル酸の光異性化は透熱(非断熱)ポテンシャルを通るというモデルを仮定し、励起状態 MD シミュレーションを行なった。そして我々は PYP の光異性化反応を再現した。クマル酸の C8 原子の運動の結果として芳香環が動き、Glu46 との水素結合が切断され、1ps 前後で異性化が完了するという結果を得た。興味深いことに、異性化反応は一方的であった。既存の実験との比較について、当日議論したい。

A. Yamada, S. Yamamoto, T. Yamato, and T. Kakitani : Analysis of photoisomerization reaction of PYP by MD simulation